



Karakter morfologi, biologi, dan molekuler tiga isolat *Helicoverpa armigera* Nucleopolyhedrovirus (*HearNPV*) terhadap penggerek buah kapas *Helicoverpa armigera* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae)

Morphology, biology, and molecular characteristics of three isolates of *Helicoverpa armigera* Nucleopolyhedrovirus (*HearNPV*) against cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae)

Farriza Diyasti^{1*}, Teguh Santoso², R. Yai Munara Kusumah²

¹Direktorat Perlindungan Perkebunan

Jalan Harsono RM No. 3, Ragunan-Pasar Minggu, Jakarta Selatan 12550

²Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor

Jalan Kamper, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

(diterima November 2015, disetujui Maret 2016)

ABSTRAK

Helicoverpa armigera Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) merupakan hama penting pada kapas. Kehilangan hasil akibat serangan hama ini dapat mencapai 70%. Pengendalian hama ini menggunakan *nucleopolyhedrovirus* (NPV) terbukti efektif di lapangan. Isolat NPV yang diperoleh dari spesies inang yang sama di lokasi geografis yang berbeda dapat menunjukkan variasi genetik dan perbedaan dalam biologinya. Penelitian ini bertujuan membandingkan karakteristik morfologi, biologi, dan molekuler ketiga isolat *HearNPV* yang berasal dari perkebunan kapas di Sulawesi Selatan, Jawa Tengah, dan Jawa Timur. *Scanning electron microscope* (SEM) digunakan untuk melihat karakter morfologi, sedangkan karakter biologi diamati dengan mencelupkan pipilan jagung muda pada tiap suspensi isolat dengan kerapatan $2,5 \times 10^3$, $2,5 \times 10^4$, $2,5 \times 10^5$, $2,5 \times 10^6$, dan $2,5 \times 10^7$ POBs/ml serta kontrol menggunakan akuabides kemudian diberikan pada larva *H. armigera* instar-1. Analisis probit dilakukan untuk menghitung nilai LC dan LT. Uji molekuler menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR) dengan bantuan primer gen *lef-8*. Hasil menunjukkan ketiga isolat memiliki bentuk dan ukuran polihedra yang tidak berbeda nyata dengan rerata diameter 0,86 μ m. Pada 7 HSI, isolat *HearNPV* dari Jawa Timur menunjukkan persentase mortalitas tertinggi dengan nilai LC_{50} terendah, yaitu 6,38 POBs/ml, sedangkan nilai LT_{50} pada kerapatan $2,5 \times 10^7$ POBs/ml terendah ditunjukkan oleh isolat Jawa Timur dan Sulawesi Selatan, yaitu 2,7 HSI. Sementara itu, hasil sekuensing DNA dari ketiga isolat tersebut menunjukkan kemiripan yang tinggi (homologi 100%).

Kata kunci: homologi, kerapatan, LC, mortalitas, POB

ABSTRACT

Helicoverpa armigera Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) is one of the most important pests on cotton. Yield losses due to this pest can reach up to 70%. Pest control using the NPV has been proven to be effective in the field. However NPV isolates from different geographical locations could be showed variation in genetic and their biology. The purpose of this study was to compare morphology, biology, and molecular characteristics between three *HearNPV* isolates from cotton

*Penulis korespondensi: Farriza Diyasti. Direktorat Perlindungan Perkebunan, Jalan Harsono RM No.3, Ragunan-Pasar Minggu, Jakarta Selatan 12550
Tel: 021-7815380-4, Faks: 021-7815486, 7815586, Email: riza.diyasti@gmail.com.

field in South Sulawesi, Central Java, and East Java. Scanning electron microscope (SEM) was used to look at morphological characters, whereas biological characters were observed by dipping shelled of young corn cob on each isolate suspension with a density of 2.5×10^3 , 2.5×10^4 , 2.5×10^5 , 2.5×10^6 , 2.5×10^7 POBs/ml and control then fed to the first instar larvae of *H. armigera*. Probit analysis was used to determine LC and LT. The molecular assay used polymerase chain reaction (PCR) with *lef-8* gene. The results showed that the three isolates had the shape and size of polyhedra which was not significantly different with the mean diameter were $0.86 \mu\text{m}$. The result showed that in 7 days post infection, *HearNPV* isolate from East Java was the most virulent isolates with the lowest LC_{50} , which is 6.38 POBs/ml, but lowest LT_{50} value in 2.5×10^7 POBs/ml were showed both from East Java and South Sulawesi, which are 2.7 days post infection. Meanwhile, the DNA sequencing of the three isolates showed a high similarity (100% homology).

Key words: density, homology, LC, mortality, POB

PENDAHULUAN

Helicoverpa armigera Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) merupakan salah satu hama utama kapas yang menjadi faktor pembatas produksi. Larva *H. armigera* merusak kapas dengan cara menggerek kuncup, bunga, dan buah kapas sehingga menyebabkan buah kapas tersebut tidak dapat berkembang dan gugur. Menurut Nasreen et al. (2004), satu individu larva *H. armigera* dapat menghabiskan 40–57% kuncup, bunga, dan buah kapas dalam satu pohon selama fase hidupnya.

Pada skala lapangan, *nucleopolyhedrovirus* (NPV) dapat menekan kerusakan buah kapas sehingga mengurangi kehilangan hasil produksi kapas berbiji rerata 21,37% (255,2 kg/ha) (Indrayani et al. 1998). Aplikasi NPV di laboratorium mampu menurunkan konsumsi makan *H. armigera* antara 25–50% dari berat kering pakan normal (Rustama & Niloperbowo 2009). Efektivitas virus ini dipengaruhi oleh biologi inang, virulensi virus, dan ekologi virus (Trevor et al. 2005). Isolat *Baculovirus* yang diperoleh dari spesies yang sama di lokasi geografis yang berbeda sering menunjukkan variasi genetik dan perbedaan dalam biologinya (Cory et al. 2005). Penelitian terkait variasi *strain Baculovirus* di Indonesia telah dilakukan oleh Zelazny et al. (1977) yang menemukan adanya variasi genetik dan virulensi *Baculovirus Oryctes rhinoceros* (Coleoptera: Scarabaeidae) yang menyerang hama *Oryctes rhinoceros* Linnaeus pada sentra perkebunan kelapa di Indonesia. Berbagai variasi agroklimat yang beragam pada bentang wilayah yang cukup luas di Indonesia memungkinkan adanya variasi *strain Baculovirus* pada ekosistem lain, salah satunya kapas. Sentra kapas di Indonesia tersebar di Jawa Tengah, Jawa Timur, Sulawesi Selatan, Sulawesi Tenggara, Nusa

Tenggara Timur (NTT), Nusa Tenggara Barat (NTB), dan Bali.

Karakterisasi molekuler melalui teknik *polymerase chain reaction* (PCR) merupakan salah satu cara untuk mengidentifikasi suatu gen. Dengan menggunakan *primer gen late expression factor 8 (lef-8)* yang dapat mengamplifikasi DNA NPV pada Lepidoptera diharapkan dapat memberikan informasi karakter molekuler dari isolat *HearNPV* di Indonesia. Dengan demikian penelitian ini bertujuan untuk mengkaji perbedaan isolat *Helicoverpa armigera* NPV (*HearNPV*) dari beberapa wilayah sentra perkebunan kapas di Indonesia terkait karakter morfologi, biologi, dan molekulernya.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan dari bulan September 2014–Agustus 2015. Sampel isolat *HearNPV* diperoleh dari perkebunan kapas di Kabupaten Gowa-Provinsi Sulawesi Selatan, Kabupaten Wonogiri, Provinsi Jawa Tengah dan Kabupaten Situbondo, Provinsi Jawa Timur. Uji bioesai dan pengolahan data dilakukan di Laboratorium Patologi Serangga, Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor (IPB). Karakterisasi molekuler dilakukan di Laboratorium Virologi Tumbuhan, Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, IPB. Pengamatan morfologi polihedra dilakukan di Laboratorium Zoologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI)-Cibinong.

Pemeliharaan serangga inang

Larva *H. armigera* diperoleh dari pertanaman jagung di Kelurahan Ciparigi, Kecamatan Bogor

Utara dan dipelihara secara individual dalam mangkok plastik berdiameter 5,5 cm dan tinggi 4,7 cm menggunakan pakan tongkol jagung muda. Pupa yang terbentuk dipindahkan ke wadah plastik berdiameter 34 cm dan tinggi 35 cm yang bagian dasarnya diisi dengan serbuk kayu. Bagian atas wadah ditutup dengan kain kasa sebagai tempat peletakan telur. Ngengat diberi pakan larutan madu 10% yang diresapkan pada kapas. Telur yang diletakkan pada kain kasa dipanen setiap hari. Setelah 24 jam, dilakukan sterilisasi terhadap permukaan telur menggunakan *sodium hypochlorite* 0,1%. Larva yang diperoleh digunakan untuk tahap penelitian selanjutnya.

Isolasi dan perbanyakan NPV

Sampel *cadaver* ulat *H. armigera* yang menunjukkan gejala terserang NPV dari ketiga wilayah (Provinsi Sulawesi Selatan, Jawa Tengah, dan Jawa Timur) dikumpulkan kemudian dimurnikan di laboratorium. *Cadaver* digerus dengan mortar dalam larutan SDS 0,1%, kemudian disaring menggunakan kain kasa berukuran 100 *mesh*. Filtrat dituang ke dalam tabung mikro 2 ml, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 1 menit. Pelet yang terbentuk dibuang, supernatan diambil dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Pelet yang terbentuk ditambahkan beberapa tetes akuabides (Cheng 1998). Pemurnian virus dilakukan dengan metode gradien sukrosa yang dibuat secara kontinu pada tabung mikro 2 ml (Grzywacz et al. 2011). Selanjutnya, disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 99 menit. Pita putih yang terbentuk diambil dengan menggunakan pipet pasteur dan disuspensikan kembali dengan menambahkan beberapa tetes akuabides. Suspensi tersebut disentrifugasi kembali pada 7000 rpm selama 20 menit. Endapan yang terbentuk diambil dan ditambahkan akuabides. Irisan jagung dicelupkan ke dalam suspensi tersebut untuk selanjutnya digunakan sebagai pakan larva instar-3 *H. armigera*. Ulat yang mati setelah mengonsumsi pakan tersebut, dikumpulkan dan diproses dengan metode yang sama untuk mendapatkan NPV yang diperlukan untuk tahap penelitian selanjutnya.

Pengamatan morfologi polihedra isolat *HearNPV*

Suspensi polihedra murni tiap isolat ditempatkan pada *coverglass* sebanyak satu lup inokulasi kemudian dikeringanginkan. Setelah

kering, *coverglass* tersebut ditempelkan pada *stub* dengan menggunakan *double tape carbon*. Sampel kemudian dilapisi (*coated*) dengan emas menggunakan ion *sputtering device* (JEOL FINE COAT tipe JFC-1100 E) selama 4 menit dengan arus listrik sebesar 10 A. Setelah pelapisan, sampel tersebut diamati dengan menggunakan SEM (Tipe JEOL JSM-5200) pada perbesaran 5000 kali.

Bioesai NPV terhadap *H. armigera*

Suspensi polihedra murni tiap isolat ditentukan kerapatannya dengan menggunakan *haemocytometer*. Kerapatan yang digunakan, yaitu $2,5 \times 10^3$, $2,5 \times 10^4$, $2,5 \times 10^5$, $2,5 \times 10^6$, dan $2,5 \times 10^7$ POBs/ml. Pipilan jagung muda dicelupkan ke dalam masing-masing suspensi *HearNPV* dan diberikan pada larva *H. armigera* instar-1 sebanyak 20 individu tiap perlakuan. Perlakuan diulang sebanyak empat kali. Kontrol menggunakan pipilan jagung muda yang dicelupkan ke dalam akuabides.

Ekstraksi dan amplifikasi DNA

Polihedra yang telah dimurnikan menggunakan gradien sukrosa pada metode sebelumnya diresuspensi dengan larutan sodium karbonat (Na_2CO_3 , pH 11), dan didiamkan pada suhu 37 °C selama 30 menit, kemudian disentrifugasi kembali menggunakan tabung mikro 2 ml pada 13000 rpm selama 1 jam hingga terbentuk pelet yang merupakan kumpulan virion NPV. Virion dimurnikan dengan metode yang sama pada pemurnian polihedra (Cheng 1998), selanjutnya dilakukan ekstraksi DNA dengan menggunakan *Viral nucleic acid extraction kit II* (Geneaid VR050).

Amplifikasi menggunakan primer gen *lef-8* dengan urutan oligonukleotida *primer forward* 5'-ATGAATTGCAAACCTCTCCGCCAG-3' dan *reverse* 3'-TCGACTGCAGACC-GCCGAAGA-5' (Kaur et al. 2014). Untuk amplifikasi tiap isolat *HearNPV*, sebanyak 2 µl DNA hasil ekstraksi dicampur dengan reagen yang terdiri atas 8 µl ddH₂O, 12,5 µl Taq DNA polymerase, masing-masing 1 µl primer, 0,5 µl MgCl hingga volume akhir yang digunakan dalam amplifikasi sebanyak 25 µl. Amplifikasi dilakukan pada mesin PCR (*gene amp system 9700*). Satu siklus amplifikasi meliputi tiga tahapan utama, yaitu denaturasi 94 °C selama 1 menit, penempelan 61 °C selama 1 menit, dan ekstensi 72 °C selama 1 menit. Siklus diulangi

sebanyak 35 kali. Proses elektroforesis dilakukan dengan memasukkan 5 µl DNA hasil amplifikasi ke dalam sumur gel agarose 1% yang direndam dalam larutan *Tris Borate EDTA* (TBE) kemudian dialiri dengan arus listrik 50 volt selama 50 menit. Selanjutnya, direndam dalam larutan ethidium bromida (EtBr) selama 30 menit. Visualisasi DNA dilakukan dengan cara meletakkan gel agarose pada UV-transiluminator.

Analisis data

Bioesai *HearNPV*. Pengamatan dilakukan terhadap mortalitas, tanda, serta gejala penyakit yang muncul tiap hari hingga seluruh larva uji mati. Persentase larva yang mati dihitung dan apabila terdapat mortalitas pada perlakuan kontrol (tidak lebih dari 20%) maka mortalitas larva dikoreksi dengan formula Abbott (1925) dengan rumus sebagai berikut:

$$P = \frac{P' - C}{P' - 100} \times 100\%, \text{ dengan}$$

P: mortalitas terkoreksi (%); P': mortalitas hasil pengamatan pada setiap perlakuan *HearNPV* (%); C: mortalitas pada kontrol (%). Data diolah dengan menggunakan probit (Finney 1971) pada program *statistical analysis system* (SAS) untuk memperoleh nilai *lethal concentration* (LC₅₀ dan LC₉₀), dan *lethal time* (LT₅₀ dan LT₉₀).

Pengurutan DNA dan analisis filogeni. Pengurutan fragmen DNA hasil amplifikasi dilakukan oleh 1st BASE Singapura melalui PT. Genetica Science. Urutan nukleotida sampel dibandingkan dengan urutan nukleotida NPV lain yang telah dipublikasikan di situs National Centre for Biotechnology Information (NCBI) melalui program BLAST (Basic Local Alignment Search Tools). Data urutan nukleotida yang terpilih

dianalisis menggunakan program penjajaran dan ClustalW dengan program Bioedit ver 7.1.7 untuk mengetahui homologi tiap sampel.

HASIL

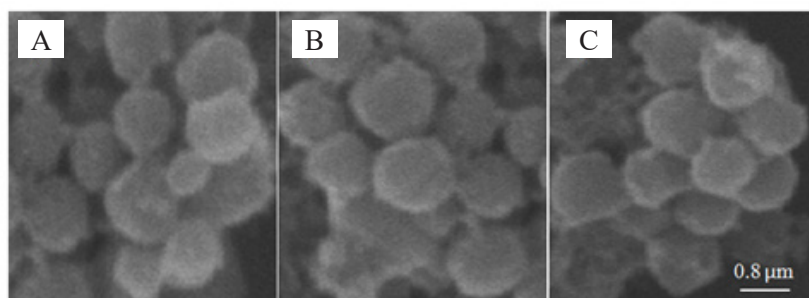
Bentuk dan ukuran polihedra

Pengamatan menggunakan SEM menunjukkan bentuk polihedra pada isolat *HearNPV* Sulawesi Selatan, Jawa Tengah, dan Jawa Timur dengan ukuran yang tidak jauh berbeda. Polihedra isolat *HearNPV* Sulawesi Selatan berukuran d = 0,84 µm, isolat *HearNPV* Jawa Tengah berukuran d = 0,92 µm, dan polihedra isolat *HearNPV* Jawa Timur berukuran d = 0,87 µm (Gambar 1).

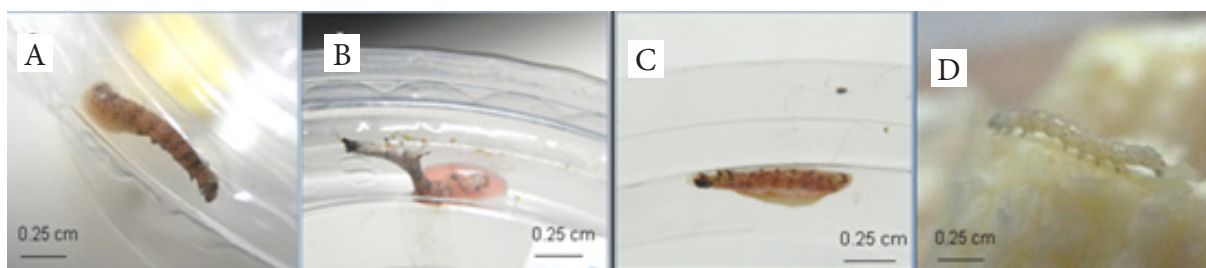
Bioesai NPV terhadap *H. armigera*

Larva *H. armigera* yang mati akibat NPV menunjukkan gejala pergerakan melambat, aktivitas makan berkurang, dan cenderung berdiam diri pada bagian atas wadah percobaan (bagian tutup) yang pada akhirnya mati mengeluarkan cairan tubuh yang mengandung jutaan polihedra (Gambar 2). Uji bioesai menunjukkan bahwa pada kerapatan tinggi (>2,5 x 10⁵ POBs/ml), isolat *HearNPV* Sulawesi Selatan memiliki persentase mortalitas tertinggi terhadap *H. armigera*, sedangkan pada kerapatan rendah (≤ 2,5 x 10⁵ POBs/ml), isolat *HearNPV* Jawa Timur justru menunjukkan mortalitas *H. armigera* lebih tinggi dibandingkan dengan kedua isolat lainnya (Tabel 1). Semakin tinggi kerapatan maka semakin tinggi pula persentase mortalitas *H. armigera*.

Analisis probit memperlihatkan adanya perbedaan patogenisitas pada ketiga isolat *HearNPV* (Tabel 2). Pada 7 HSI, isolat *HearNPV* asal Jawa Timur menunjukkan nilai LC₅₀ dan LC₉₀



Gambar 1. Polihedra tiga isolat *HearNPV* melalui SEM 5000x. A: Sulawesi Selatan; B: Jawa Tengah; dan C: Jawa Timur.



Gambar 2. Gejala larva *Helicoverpa armigera* terinfeksi oleh tiga isolat *HearNPV* pada 4 HSI. A: Sulawesi Selatan; B: Jawa Tengah; C: Jawa Timur; dan D: kontrol.

Tabel 1. Pengaruh tiga isolat *HearNPV* terhadap persentase mortalitas kumulatif larva *Helicoverpa armigera*

HSI	Mortalitas (%) ^a														
	Kerapatan isolat <i>HearNPV</i> (POBs/ml)														
	2,5 x 10 ³			2,5 x 10 ⁴			2,5 x 10 ⁵			2,5 x 10 ⁶			2,5 x 10 ⁷		
	SS	JTG	JTM	SS	JTG	JTM	SS	JTG	JTM	SS	JTG	JTM	SS	JTG	JTM
1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0	0,0	1,3	0,0	2,5	3,8	0,0	2,5
2	0,0	5,1	12,5	2,5	6,3	18,8	12,5	7,6	22,5	32,5	14,0	31,3	41,3	12,7	31,3
3	15,0	15,3	18,9	22,5	28,0	35,3	32,5	28,0	37,8	63,8	39,4	49,1	80,0	40,7	49,1
4	37,7	29,3	52,3	52,8	39,5	57,4	62,8	53,6	72,7	77,9	57,4	75,3	85,3	70,2	75,3
5	56,8	42,4	66,3	70,7	54,0	67,6	75,8	66,8	79,0	84,6	70,7	85,5	88,5	77,1	85,5
6	63,6	54,0	69,9	73,8	63,0	71,2	80,2	74,6	80,4	85,3	78,4	90,6	89,2	83,5	90,6
7	70,5	61,7	76,4	76,9	69,4	79,0	83,3	82,3	82,9	88,5	83,5	85,5	92,2	87,4	100
8	75,6	68,1	80,3	83,3	74,6	85,5	85,3	86,1	85,5	89,1	86,1	100	100	100	-
9	77,5	74,6	82,9	84,0	79,7	100	87,2	88,7	100	100	100	-	-	-	-
10	81,4	81,0	84,2	85,3	84,8	-	100	100	-	-	-	-	-	-	-
11	84,0	82,3	85,5	100	88,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	89,3	83,5	100	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	100	87,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	90,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^aRerata mortalitas terkoreksi (Abott 1925), SS: isolat *HearNPV* Sulawesi Selatan, JTJG: isolat *HearNPV* Jawa Tengah, JTM: isolat *HearNPV* Jawa Timur

HSI: hari setelah inokulasi; -: menunjukkan mortalitas sudah mencapai 100%.

terendah, yaitu pada kerapatan 6,36 POBs/ml dan $6,56 \times 10^3$ POBs/ml, disusul oleh isolat *HearNPV* Sulawesi Selatan dengan kerapatan 9,80 POBs/ml pada LC_{50} dan $3,89 \times 10^4$ POBs/ml pada LC_{90} , selanjutnya isolat *HearNPV* Jawa Tengah dengan kerapatan $4,16 \times 10^2$ POBs/ml pada LC_{50} dan $4,04 \times 10^5$ POBs/ml pada LC_{90} . Pada kerapatan $2,5 \times 10^7$ POBs/ml, isolat *HearNPV* Sulawesi Selatan dan Jawa Timur menunjukkan nilai LT_{50} dan LT_{90} yang tidak berbeda nyata (Tabel 2). Kedua isolat tersebut mampu mematikan 50% populasi larva uji pada 2,7 HSI dan 90% pada 4–5 HSI. Persamaan regresi yang terbentuk dari nilai virulensi isolat *HearNPV* Jawa Timur, yaitu $y = 3,5x + 77,5$

sehingga menghasilkan kurva yang sangat landai dengan nilai kemiringan (variabel X) 3,5 (Gambar 3). Hal ini mengindikasikan bahwa setiap terjadi perubahan nilai variabel bebas X (Log [K]) maka akan diikuti oleh perubahan variabel tidak bebas Y (probit mortalitas) sebesar 77,5.

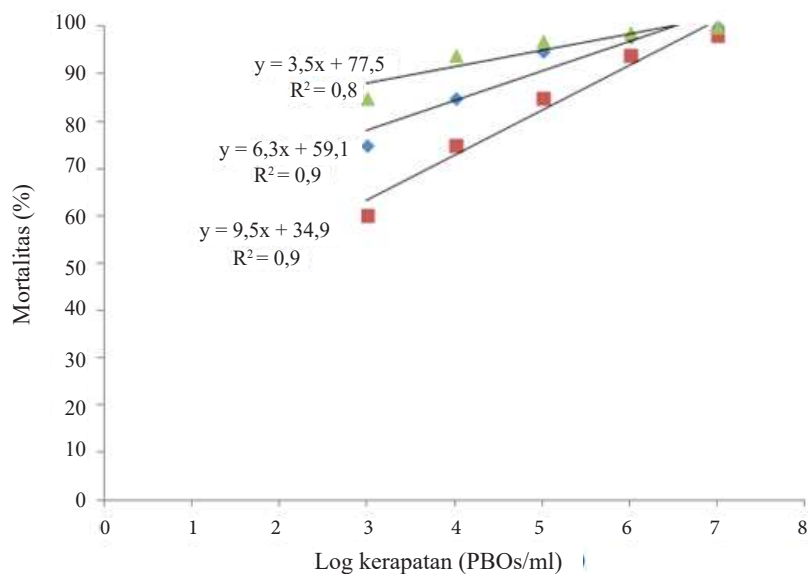
Karakter molekuler

Amplifikasi DNA *HearNPV* dengan primer *forward* dan *reverse* gen *lef-8* menunjukkan hasil yang baik, terlihat dari terbentuknya pita DNA 1, 2, dan 3. Total pita yang terlihat sesuai dengan target yang diinginkan, yaitu berukuran sekitar 789 pb (panjang basa) (Gambar 4). Berdasarkan

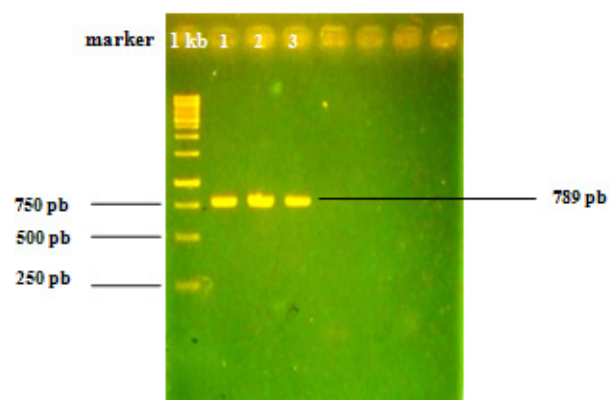
Tabel 2. Nilai LC dan LT tiga isolat *HearNPV* terhadap mortalitas larva *Helicoverpa armigera* ($\alpha = 5\%$)

Isolat <i>HearNPV</i>	Virulensi pada 7 HSI (POBs/ml)		Kecepatan membunuh pada $2,5 \times 10^7$ POBs/ml (HSI)	
	LC ₅₀	LC ₉₀	LT ₅₀	LT ₉₀
Sulawesi Selatan	9,8 (2,82–5,37 x 10 ²)	3,9 x 10 ⁴ (1,55 x 10 ⁴ –1,17 x 10 ⁵)	2,7 (2,32–3,05)	4,4 (3,85–5,24)
Jawa Tengah	4,2 x 10 ² (3,98 x 10–1,62 x 10 ³)	4,0 x 10 ⁵ (1,28 x 10 ⁵ –1,55 x 10 ⁶)	3,2 (2,99–3,42)	6,0 (5,59–6,45)
Jawa Timur	6,4 (6,92 x 10 ⁻⁴ –1,26 x 10 ²)	6,6 x 10 ³ (7,76 x 10 ² –2,29 x 10 ⁴)	2,7 (2,51–2,88)	4,8 (4,45–5,20)

HSI: hari setelah inokulasi

**Gambar 3.** Mortalitas probit (*lethal concentration*) tiga isolat *HearNPV* terhadap *Helicoverpa armigera* pada 7 HSI. ◆: Sulawesi Selatan; ■: Jawa tengah; ▲: Jawa Timur.

analisis pensejajaran, isolat *HearNPV* Sulawesi Selatan, Jawa Tengah, dan Jawa Timur memiliki daerah *consensus* yang sama sehingga mengindikasikan bahwa ketiganya merupakan *strain HearNPV* yang sama dengan homologi 100% (Tabel 3). Selain itu, ketiga isolat *HearNPV* asal Indonesia ini menunjukkan kekerabatan tinggi dengan isolat *H. zea* NPV asal Brazil (No. akses Genbank: KM596835.1), dan *H. armigera* NPV Spanyol (No. akses Genbank: KJ701033.1). Homologi yang tinggi juga ditunjukkan oleh isolat pembanding lainnya, yaitu *HearNPV* India (No. akses Genbank: FJ157286.1), Nigeria (No. akses Genbank: AP010907.1), Australia (No. akses Genbank: JN584482.1), dan Cina (No. akses Genbank: AF271059.2).

**Gambar 4.** Hasil visualisasi DNA *HearNPV*. 1: Sulawesi Selatan; 2: Jawa Tengah; dan 3: Jawa Timur. Menggunakan primer gen *lef-8*.

Tabel 3. Homologi *HearNPV* Sulawesi Selatan, Jawa Tengah, dan Jawa Timur gen *lef-8* dengan sampel dari GenBank

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	ID								
2	1	ID							
3	1	1	ID						
4	1	1	1	ID					
5	1	1	1	1	ID				
6	0,987	0,87	0,987	0,987	0,987	ID			
7	0,989	0,989	0,989	0,989	0,989	0,992	ID		
8	0,987	0,987	0,987	0,987	0,987	1	0,992	ID	
9	0,984	0,984	0,984	0,984	0,984	0,982	0,979	0,982	ID

1: *HearNPV* Sulawesi Selatan; 2: *HearNPV* Jawa Tengah; 3: *HearNPV* Jawa Timur; 4: *HearNPV* Spanyol; 5: *HezeNPV* Brazil; 6: *HearNPV* Australia; 7: *HearNPV* Nigeria; 8: *HearNPV* Cina; 9: *HearNPV* India; ID : Identity.

PEMBAHASAN

Pada pengamatan dengan menggunakan SEM, ukuran polihedra dari ketiga isolat *HearNPV* cenderung sama, tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Cheng (1998) mengemukakan ukuran dan bentuk polihedra (OB) cukup bervariasi bergantung pada spesies. Penelitian yang dilakukan Sudhakar & Mathavan (1999) menunjukkan ukuran polihedra NPV asal India berkisar 0,6–2,3 μm yang sebagian besar berbentuk bulat, namun untuk menggambarkan perbedaan mendalam dapat melalui pengirisan melintang (*cross-section*) pada polihedra agar diketahui jumlah partikel virus dalam satu polihedra. Hal ini diperkuat oleh Guo et al. (2006) yang menyatakan bahwa patogenisitas dan kecepatan membunuh isolat *HearNPV* terhadap larva *H. armigera* tidak berkorelasi dengan bentuk dan ukuran polihedra melainkan berpengaruh terhadap produksi *occlusion derived virus* (ODV). Uji bioesai menunjukkan bahwa dengan meningkatnya kepadatan *HearNPV* yang diinokulasikan pada larva instar pertama *H. armigera* maka semakin meningkat pula jumlah larva uji yang mati. Pada kepadatan rendah ($2,5 \times 10^3$ POBs/ml), ketiga isolat mampu mematikan seluruh populasi larva uji setelah 10 HSI. Pada kepadatan tinggi ($2,5 \times 10^7$ POBs/ml), ketiga isolat mampu mematikan seluruh populasi larva uji pada 7 HSI. Efektifitas penggunaan *HearNPV* untuk mengendalikan hama *H. armigera* dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kepadatan virus,

pengaruh radiasi, instar ulat yang diserang dan isolat virus (Asri et al 2003). Percobaan yang dilakukan oleh Gundannavar & Lingappa (2004) pada isolat *HearNPV* dengan kepadatan 10^6 POBs/ml dapat menyebabkan mortalitas *H. armigera* dari 50–100% dalam kurun waktu 5–8 HSI. Pada kepadatan yang lebih rendah, yaitu 10^3 POBs/ml, mortalitas larva uji mencapai 66,67% pada 10 HSI. Kepadatan infeksi untuk NPV bervariasi terhadap usia larva, semakin tua larva uji yang digunakan maka kepadatan yang diperlukan juga semakin meningkat. Menurut Pourmirza (2000), tidak ada perbedaan kerentanan yang signifikan antar instar larva dalam mengekspresikan polihedra/mg dalam masing-masing berat larva. Dengan demikian, penggunaan instar-1 (*neonate*) sebagai larva uji dapat dilakukan dengan pertimbangan kebugaran larva yang seragam mudah diperoleh, jumlah larva uji yang dibutuhkan cukup besar, dan kemudahan dalam memperoleh larva uji bebas kontaminan cukup praktis dilakukan melalui sterilisasi permukaan telur (Grzywacz et al. 2011), serta efisiensi waktu dan ekonomi (Gunning 2011).

Perbedaan isolat NPV diduga memengaruhi mekanisme kerja virus tersebut dalam mematikan inangnya. Menurut Grzywacz et al. (2011), virion yang terlepas melewati membran peritrofik pada saluran pencernaan dan melebur dengan mikrovili pada sel epitel kolumnar. Virion mengandung nukleokapsid yang di dalamnya terdapat DNA, akan masuk ke dalam sitoplasma dan menuju inti sel melalui pori pada inti sel. Hal ini merupakan

siklus replikasi awal dari virus. Nukleokapsid beristirahat dan DNA mulai bereplikasi. Selama kurang lebih satu jam setelah infeksi, virus mulai bereplikasi. Nukleus mengalami pembengkakan pada delapan jam setelah infeksi. Setelah itu, progeni virus membentuk tunas disebut peplomer (*budded virus*) untuk bermigrasi di luar sel. Produksi polihedra ini biasanya memakan waktu 48 jam. Pada tahap ini siklus primer telah selesai dan selanjutnya memulai siklus kedua dengan menginfeksi jaringan tubuh lainnya. Gejala infeksi virus pada serangga akan menunjukkan adanya perubahan bertingkat dalam warna integumen yang semakin bertambah gelap dan tampak berminyak (Toprak et al. 2005). Kutikula larva yang terinfeksi NPV menipis dan menjadi rapuh akibat kinerja gen cathepsin dan enzim kitinase yang terdapat dalam genom *Baculovirus*. Adapun perkembangan fase larva yang terinfeksi NPV cenderung lebih lamban dan lama. Hal ini disebabkan oleh adanya fungsi gen *ecdysteroidglucosyl transferase (egt)* yang dimiliki oleh NPV (Etebari et al. 2007) yang berfungsi menonaktifkan hormon *ecdysteroid* serangga inang sehingga stadia larva dari serangga yang terinfeksi virus akan semakin panjang (Koul & Dhaliwal 2002).

Derajat patogenisitas (virulensi) virus ini didasarkan pada kemampuan virus membunuh organisme sasaran dalam jumlah yang besar dan waktu yang singkat. Nilai LC dan LT yang rendah menunjukkan sifat patogenisitas yang tinggi (Finney 1971). Isolat *HearNPV* Jawa Timur mampu mematikan larva uji dalam jumlah cukup besar pada kerapatan minimum. Selanjutnya, disusul oleh isolat *HearNPV* Sulawesi Selatan, kemudian Jawa Tengah. Brown (1982) menyatakan bahwa virus yang berasal dari spesies inang yang sama, namun dari lokasi geografis yang berbeda menunjukkan variasi dalam virulensi, karakter biologi, dan perbedaan dalam susunan DNA.

Pengamatan karakter molekuler ketiga isolat ini dengan PCR menggunakan gen *lef-8* menunjukkan isolat *HearNPV* Sulawesi Selatan, Jawa Tengah, dan Jawa Timur pada satu *strain* yang sama dengan tingkat homologi 100%. Li et al. (2009) mengemukakan bahwa suatu spesies dikatakan identik apabila persentase kemiripan >73%. Gen *lef-8* mampu mengamplifikasi DNA NPV Lepidoptera (Acharya & Gopinathan 2002). Gen *lef-8* merupakan gen ekspresi pada NPV

yang cukup stabil mengkode subunit DNA dan menempel langsung pada RNA polimerase virus secara spesifik (Herniou et al. 2003). Patogenisitas virus merupakan proses yang kompleks dan melibatkan aksi dari beberapa gen (Griffiths et al. 1999). Sekuen polihedrin baik nukleotida maupun asam amino digunakan untuk mengidentifikasi kekerabatan dan asal-usul variasi NPV. Sejalan dengan ini, sekuen *lef-8* juga memiliki fungsi yang sama dengan sekuen polihedrin. Protein polihedrin dan gen *lef-8* mengatur struktur dan fungsi protein pada *Baculovirus* (Kaur et al. 2014). Beberapa kelompok *strain* dengan nilai kemiripan yang tinggi, akan dicatat berdasarkan posisi relatif nukleotida pada sekuen tiap individu sehingga akan menunjukkan kesamaan unit dasar pada genom bukan pada pola situs pemotongan. Ada beberapa susunan nukleotida yang terlihat berbeda namun memiliki fungsi gen yang sama, dengan adanya gen *lef-8* akan memadatkan fungsi tersebut dengan menetralkannya berdasarkan degenerasi penggunaan kodon. Isolat *HearNPV* Sulawesi Selatan, Jawa Tengah, dan Jawa Timur (Indonesia) pada penelitian ini menunjukkan hubungan kekerabatan yang cukup dekat dengan isolat *Helicoverpa* NPV dari Brazil, Spanyol, Cina, Nigeria, India, dan Australia. Hal ini diduga karena keenam negara tersebut juga merupakan negara penghasil kapas cukup besar di dunia sehingga adanya kemungkinan sejarah penyebaran dan penggunaan *strain HearNPV* yang berasal dari satu wilayah yang sama. Adapun variasi patogenisitas di antara tiga isolat *HearNPV* diduga karena perbedaan iklim pada wilayah tersebut. Peningkatan temperatur suatu wilayah dapat menghasilkan *strain* virus dengan virulensi tinggi, namun berkorelasi negatif dengan kelembaban (Gopali & Lingappa 2001).

KESIMPULAN

Isolat *HearNPV* dari Jawa Timur menunjukkan persentase mortalitas tertinggi dengan nilai LC₅₀ dan LC₉₀ terendah, yaitu 6,38 POBs/ml dan 6,56 x 10³ POBs/ml, dibandingkan dengan isolat *HearNPV* Sulawesi Selatan dan Jawa Tengah. Perbedaan patogenisitas ini tidak berkorelasi dengan bentuk dan ukuran polihedra NPV. Berdasarkan analisis urutan DNA, ketiga

isolat *Hear*NPV ini merupakan *strain* virus yang sama dan memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan isolat *Heze*NPV Brazil, *Hear*NPV Spanyol, Cina, Nigeria, India, dan Australia.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbott WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18:265–267. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>.
- Asri MT, Isnawati, Hidayat MT. 2003. Konsentrasi Virus *Ha*NPV isolat Yogyakarta yang efektif untuk mengendalikan ulat *Helicoverpa armigera*. *Jurnal Pendidikan Matematika dan Sains* 3:150–154.
- Acharya A, Gopinathan KP. 2002. Characterization of late gene expression factors *lef-9* and *lef-8* from *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology* 83:2015–2023. doi: <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-83-8-2015>.
- Brown DA. 1982. Two naturally occurring nuclear polyhedrosis variant of *Neodiprion sertifer* Geoffr. (Hymenoptera: Diprionidae). *Applied and Environmental Microbiology* 43:65–69.
- Cheng XW, Carner GR. 2000. Characterization of a single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus of *Thysanoplusia orichalcea* L. (Lepidoptera: Noctuidae) from Indonesia. *Journal of Invertebrate Pathology* 75:279–87. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/jipa.2000.4933>.
- Cory JS, Green BM, Paul RK, Hunter-Fujita F. 2005. Genotypic and phenotypic diversity of a *Baculovirus* population within an individual insect host. *Journal of Invertebrate Pathology* 89:101–111. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2005.03.008>.
- Etebari K, Matindoost L, Mirhoseini SZ, Turnbull MW. 2007. The effect of *Bm*NPV infection on protein metabolism in silkworm (*Bombyx mori*) larvae. *Invertebrate Survival Journal* 4:13–17.
- Finney DJ. 1971. *Probit Analysis*. London: Cambridge Univ Press.
- Gopali JB, Lingappa S. 2001. Selection of virulent strain of NPV against *Helicoverpa armigera* in pigeon pea ecosystem. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences* 14:1067–1071.
- Griffiths CM, Barnett AL, Ayres MD, Windass J, King LA, Possee RD. 1999. In vitro host range of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus recombinants lacking functional. *Journal of General Virology* 80:1055–1066. doi: <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-80-4-1055>.
- Grzywacz D, Rabindra RJ, Brown M, Jones KA, Parnell M. 2011. *The Helicoverpa armigera NPV Manual Production*. FAO. Tersedia pada: <http://www.fao.org/docs/eims/upload/agrotech/2011/HearNPVmanual-pt1.pdf>. [diakses 2014 Sep. 5].
- Gundannavar KP, Lingappa Giraddi RS. 2004. Study of interaction between virus and entomofungal pathogens against *Helicoverpa armigera* Hubner. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences* 17:594–596.
- Gunning RV. 2011. Measuring insecticide resistance. In: Zalucki MP (Eds.), *Heliothis: Research Methods and Prospects*. pp. 151–160. New York: Springer Verlag New York Inc.
- Guo ZJ, Ge JQ, Wang D, Shao YM, Tang QY, Zhang CX. 2006. Biological comparison of two genotypes of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. *Biological Control* 51:809–820. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10526-006-9008-6>.
- Herniou EA, Olezewski JA, Cory JS. 2003. The genome sequence and evolution of baculoviruses. *Annual Review of Entomology* 48:211–234. doi: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.48.091801.112756>.
- Indrayani IGAA, Winarno D, Soebandrijo. 1998. Efektivitas NPV dengan berbagai bahan pembawa terhadap *Spodoptera litura* F. dan *Helicoverpa armigera* Huber pada kapas. *Jurnal Littri* 4:1–7.
- Kaur B, Gupta VK, Jindal V. 2014. Molecular filogenetic analysis of Indian strains of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus (*Hear*NPV). *Indian Journal of Biotechnology* 13:186–194.
- Koul O, Dhaliwal GS. 2002. *Microbial Biopesticides*. London: Taylor and Francis. doi: <http://dx.doi.org/10.4324/9780203303078>.
- Li YP, Yang BS, Wang H, Zia RX, Wang L, Zhang ZH, Qil L, Liu YQ. 2009. Mitochondrial DNA analysis reveals a low nucleotide diversity of *Caligula japonica* in China. *African Journal of Biotechnology* 8:2707–2712.
- Nasreen A, Cheema GM, Fareed S, Saleem MA. 2004. Resistance of different cotton cultivars to chewing insect pests. *Pakistan Entomologist* 26:81–85.
- Pourmirza AA. 2000. Relationship between nuclearpolihedrosis virus susceptibility and larval weight in *Heliothis armigera*. *Journal of Agricultural Science and Technology* 2:291–298.
- Rustama MM, Niloperbowo W. 2009. Pengaruh dosis *Helicoverpa armigera* Nucleopolyherdosis VIRUS (*Ha*NPV) terhadap konsumsi makan,

- berat badan, dan berat pupa *Helicoverpa armigera* (Huber). Tersedia di: http://repository.unpad.ac.id/4015/1/pengaruh_dosis_helicoverpa_armigera_nuclear_polyhedrosis_virus.pdf. [diunduh 2015 Sept 5].
- Sudhakar S, Mathavan S. 1999. Electron microscopical studies and restriction analysis of *Helicoverpa armigera* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Biosciences* 24:361–370. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/BF02941250>.
- Toprak U, Batram S, Gurkan MO. 2005. *Baculoviruses* as biocontrol agents, do they have a future in Turkey?. *African Journal of Microbiology* pp. 1-8.
- Trevor AJ, Allan M, Crawford, Travis R, Glare. 2005. Oryctes virus (Baculovirus oryctes). *Journal of Invertebrate Pathology* 89:91–94.
- Zelazny B. 1977. Occurrence of the *Baculovirus* disease of the coconut palm rhinoceros beetle in the Philippines and in Indonesia. *FAO Plant Protection Bulletin* 25:73–77.